

Aus dem Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. phil. W. Vogell

**Auftreten und Bindungsorte von Inselzell-
Antikörpern beim experimentellen
Insulinmangel-Diabetes von Mäusen
und Ratten**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Doris J. Schunk

1984



Aus dem Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie
der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. phil. W. Vogell

Auftreten und Bindungsorte von Inselzell-
Antikörpern beim experimentellen
Insulinmangel-Diabetes von Mäusen
und Ratten

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Doris J. Schunk

1 9 8 4

INHALTSVERZEICHNIS

SEITE

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	2
2. Material und Methoden	
2.1 Mäuse	4
2.2 Ratten	4
2.3 Isolierung der Langerhansschen Inseln	4
2.4 Protein A-Gold	5
2.5 Präparatgewinnung für die elektronenmikroskopische Untersuchung	6
3. Ergebnisse	
3.1 Bindungsverhalten von Protein A an die verschiedenen Zelltypen des Pankreas	7
3.2 Bindungsverhalten von Protein A an die verschiedenen ultrastrukturellen Zellbestandteile	11
3.3 Protein A-Gold-Bindung im Zusammenhang mit der zellulären Infiltration durch Makrophagen	22
4. Diskussion	25
Literaturverzeichnis	29

ZUSAMMENFASSUNG

Beim Insulinmangel-Diabetes des Menschen beobachtet man zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation außer einer Insulitis mit lymphozytärer Infiltration auch eine zelluläre und humorale Immunreaktion gegen Inselzellgewebe. Weder die Pathogenität dieser Inselzellantikörper noch die Antigene, gegen die sie sich richten, sind bisher bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden das Auftreten und die Bindungsorte der Antikörper an Tiermodellen untersucht. Als Tiermodelle dienten der durch niedrige Dosen Streptozotocin induzierte, experimentell-autoimmune Diabetes bei Mäusen und der spontane Diabetes von BB Wistar-Ratten. Elektronenmikroskopisch wurden die isolierten Inselorgane der diabetischen Tiere auf in vivo gebundene Antikörper untersucht. Die Bindungsstellen der IgG-Antikörper wurden durch das IgG-spezifische Protein A markiert und durch kolloidale Gold-Partikel elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht.

Bei beiden Tierspezies traten gebundene Antikörper auf, sowohl in endokrinen Zellen, als auch - in geringerem Maße - in exokrinen Zellen. Dabei waren die Antikörper zum größten Teil an das rauhe endoplasmatische Retikulum gebunden, weniger an Sekretgranula und Mitochondrien. Bindung an die Zelloberfläche oder an den elektronendichten Inhalt der Sekretgranula wurde hingegen nicht beobachtet. Die Anzahl der gebundenen Antikörper nahm mit dem Grad der Zellzerstörung zu. Neben diesen nicht Zell-spezifischen Antikörpern ließen sich bei den diabetischen Mäusen zusätzlich B-Zell-spezifische Antikörper nachweisen, die an die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran gebunden waren. Entsprechende B-Zell-spezifische Antikörper traten bei den diabetischen BB-Ratten nicht auf.

I. EINLEITUNG

Die Pathogenese des Typ-I-Diabetes mellitus beim Menschen ist noch weitgehend ungeklärt. Einerseits lassen der Nachweis von zellulären Immunreaktionen (1) und von Inselzellantikörpern (2,3,4) einen Autoimmunprozeß vermuten. Andererseits wird die Bedeutung von Virus-erkrankungen diskutiert, die bei dem Vorliegen von bestimmten HLA-Konstellationen (HLA-DR3 und DR4) das Auftreten von Inselzellantikörpern induzieren und zu einem juvenilen Diabetes mellitus führen können (5,6,7,8,9).

Welche Rolle die Inselzellantikörper bei der Pathogenese des Diabetes mellitus spielen, ist noch nicht bekannt. Fest steht jedoch, daß bei etwa 80 % der neuentdeckten juvenilen Diabetiker zelluläre und humorale Immunreaktionen gegen Inselzellgewebe ablaufen (10,11,12).

Bereits im frühen Stadium der Erkrankung läßt sich eine Verminderung der B-Zellen feststellen, die im weiteren Verlauf zur völligen Zerstörung aller B-Zellen führt. Histologisch findet man eine Insulitis, die über eine lymphozytäre Infiltration und Fibrose schließlich in die Nekrose der Langerhansschen Inseln mündet (13). Bei den humoralen Antikörpern im Serum handelt es sich um Inselzellantikörper (ICA, islet cell antibody) der Klasse IgG, die mit zytoplasmatischen Bestandteilen aller Inselzelltypen reagieren, und um Inselzelloberflächenantikörper (ICSA, islet cell surface antibody), die spezifisch an Oberflächenantigene von B-Zellen binden (11).

Das Auftreten von Antikörpern im Pankreasgewebe, deren Lokalisation, das zeitliche Verhalten sowie ihre Pathogenität sind noch nicht eindeutig geklärt. Für entsprechende Untersuchungen sind Tierversuche unverzichtbar. Dabei besteht die Schwierigkeit darin, Tiermodelle zu finden, die die Pathogenese des Typ-I-Diabetes beim Menschen möglichst genau wiedergeben.

Der durch mehrfache Gabe niedriger Dosen Streptozotocin induzierte Diabetes bei Mäusen und der spontane Diabetes von BB Wistar-Ratten erfüllen diese Voraussetzung. Spritzt man jungen Mäusen das B-Zell-Gift Streptozotocin in niedrigen Dosen (40 mg/kg KG), so entwickeln die Tiere einen insulinpflichtigen Diabetes. Dabei ist eine massive Infiltration der Inseln durch mononukleäre Zellen und das Auftreten von anti-Insel-IgG zu beobachten (14,15,16,17). Auch der spontan auftretende Diabetes bei BB Wistar-Ratten hat Ähnlichkeit mit dem Typ-I-Diabetes des Menschen. Der Diabetes entwickelt sich etwa mit dem Eintreten der Geschlechtsreife. Histologisch findet man eine ausgeprägte Insulitis mit selektiver Zerstörung der B-Zellen (18,19,20,21).

In der vorliegenden Arbeit wurden diese beiden Modelle gewählt, um das Auftreten und die Bedeutung der ICA elektronenmikroskopisch zu untersuchen. Dabei soll gezeigt werden, in welchem Maße die verschiedenen Zellen des Pankreas mit IgG beladen sind und an welche Zellstrukturen sich IgG binden.

Um die Bindungsstellen der Immunglobuline sichtbar zu machen, werden Substanzen benötigt, die sich zum einen spezifisch an Immunglobuline der Klasse IgG anlagern, und die zum anderen im elektronenmikroskopischen Bild kontrastgebend sind. Beide Bedingungen erfüllen mit Protein A beladene kolloidale Gold-Partikel, wobei sich Protein A spezifisch an IgG bindet und kolloidales Gold als elektronendichter Marker fungiert.

Die Anwendung dieses Markierungsverfahrens auf die genannten Tiermodelle bietet somit eine geeignete experimentelle Darstellung der ICA-Bindungsstellen beim Typ-I-Diabetes.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Mäuse

Die Untersuchung umfaßte zwei Experimentserien mit drei Gruppen von jeweils drei C57BL/6J-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) im Alter von acht bis zwölf Wochen. Die Mäuse der ersten und zweiten Gruppe erhielten an fünf aufeinander folgenden Tagen intraperitoneale Injektionen von je 40 mg Streptozotocin (Boehringer Mannheim)/kg Körpergewicht (22). Bei der ersten Gruppe wurde das Pankreas am achten Tag, bei der zweiten Gruppe am zehnten Tag nach der ersten Injektion entnommen. Die unbehandelte dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe.

2.2 Ratten

Bei diesen Tieren handelte es sich um BB Wistar-Ratten (von A.A. Like, University of Massachusetts, Worcester, USA), die aufgrund ihrer genetischen Konstellation einen spontanen Insulinmangel-Diabetes entwickeln. Die beiden Tiere der Versuchsgruppe hatten im Alter von zwölf Wochen einen manifesten Diabetes mit einer Glukosurie zwischen 300 und 400 mg/dl (Gluketur-Test, Boehringer, Mannheim) (mündliche Mitteilung von U. Kiesel). Am Tag der Manifestation wurden die Pankreasinseln für die elektronenmikroskopische Untersuchung isoliert. Zwei BB Wistar-Ratten im Alter von acht Wochen, die noch keine pathologische Glukosurie entwickelt hatten, bildeten die Kontrollgruppe.

2.3 Isolierung der Langerhansschen Inseln

Im exokrinen Gewebe des Pankreas liegen die einzelnen Zellhaufen der Langerhansschen Inseln über das ganze Organ verteilt. Sie machen nur einen kleinen Prozentsatz des gesamten Pankreas aus. Für elektronenmikroskopische Studien an den Inseln ist es deshalb sinnvoll, die Inseln zu isolieren, um so eine große Anzahl untersuchen zu können.

Dazu wurde das Pankreasparenchym ca. 20 Minuten mit Kollagenase behandelt. Danach konnten die Inseln aufgrund ihrer helleren Farbe in dem verbliebenen exokrinen Gewebe mit dem Stereomikroskop identifiziert und isoliert werden (23,24,25). Bei dieser Methode der Präparation wird angrenzendes exokrines Gewebe mitgewonnen, so daß die Untersuchung auf das Exokrinum ausgedehnt werden konnte.

2.4 Protein A-Gold

Protein A (medac GmbH, Hamburg) wird aus *Staph. aureus*, Stamm Cowan I, nach einer modifizierten Methode von Sjöquist (26) hergestellt. Es reagiert mit dem Fc-Teil von humanem Immunglobulin der Klasse IgG1, IgG2 und IgG4 sowie den Immunglobulinen $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ und $\gamma 3$ von Mäusen, wobei die Antigenbindung nicht beeinflusst wird (27,28,29).

Für den elektronenmikroskopischen Nachweis muß das Protein A an elektronendichte Marker gebunden werden. Dazu eignen sich kolloidale Gold-Partikel, die aufgrund ihrer hohen relativen Atommasse leicht elektronenmikroskopisch identifizierbar sind, und die auf ihrer Oberfläche frei wählbare Proteine tragen können (30,31,32,33). In diesem Falle wurde Protein A an Gold-Partikel mit einem Durchmesser von 17 nm gekoppelt. Das Gold-Sol wurde durch Reduktion von 0,01 % AuCl_4 mit 1 % Na-Zitrat gewonnen (34). 20 ml des Gold-Sols wurden mit 50 μl Protein A-Lösung (0,125 mmol/l) inkubiert und mit 0,8 ml 1 % Polyäthylenglykoll (PEG, Molekulargewicht 20.000) stabilisiert. Anschließend wurden die Gold-Partikel gewaschen, d.h. 30 Minuten bei 32.000 G zentrifugiert, in 0,5 ml Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) + 0,02 % PEG resuspendiert und im Verhältnis 1:5 in Eagles Medium verdünnt.

2.5 Präparatgewinnung für die elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Inselzellen der Versuchstiere, die in vivo einer starken Noxe ausgesetzt waren, mußten äußerst schonend behandelt werden, um die fragilen, vorgeschädigten Zellen nicht durch die Aufbereitung völlig zu zerstören und so der Untersuchung zu entziehen.

Im Gegensatz dazu wurden die ungeschädigten Inselzellen der Kontrolltiere willkürlich rauh pipettiert, um die Zellmembranen teilweise zu zerstören. Dieses Vorgehen war erforderlich, da Protein A-Gold die intakte Zellmembran nicht durchdringen kann, und die Zellbestandteile deshalb nur über eine Membranzerstörung der Markierung durch Protein A-Gold zugänglich gemacht werden können.

Die isolierten Inseln von Versuchs- bzw. Kontrolltieren wurden in je 100 µl Eagles Medium suspendiert und zusammen mit 100 µl der erstellten Protein A-Gold-Suspension 30 Minuten bei 4°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Fixierung in 0,5 % Glutaraldehyd und 0,1 M Cacodylat-Puffer mit 0,15 M Saccharose und 0,2 mM CaCl_2 (30 Minuten bei 4°C). Nachfixiert wurde mit 1,5 % Osmiumtetroxyd, verdünnt aus 4 %iger Stammlösung (2 Stunden bei 4°C). Schließlich wurden die Proben mit Äthanol dehydriert und in Epoxid nach Spurr eingebettet (35).

Die Schnittpräparate wurden mit dem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert-Jung) in einer Dicke zwischen 40 und 60 nm hergestellt. Die Kontrastierung erfolgte mit 2 % Uranyl-Azetat über 2 Minuten und mit Blei-Zitrat (36) über 30 Sekunden. Im Transmissions-Elektronenmikroskop (Elmiskop 1, Siemens) wurden die Schnittpräparate bei 4.000 bis 20.000-facher Vergrößerung untersucht und dokumentiert. Auf den Fotografien wurde anschließend die Bindung des Gold-Markers an die verschiedenen Zellstrukturen im Vergleich von Versuchs- zu Kontrolltieren ausgewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Bindungsverhalten von Protein A an die verschiedenen Zelltypen des Pankreas

In der elektronenmikroskopischen Auswertung zeigt sich bei den Mäusen, die acht Tage nach der ersten Streptozotocin-Injektion untersucht wurden, das Bild einer weitgehenden Zerstörung der B-Zellen. Dabei sind A- und D-Zellen, wenn auch nicht in gleichem Maße, mitbetroffen. Im Pankreas der Mäuse, die am zehnten Tag nach der ersten Streptozotocin-Injektion untersucht wurden, ist die Destruktion so weit fortgeschritten, daß in den Präparaten kaum noch endokrine Zellen zu erkennen sind, wie es in Abb. 1 dokumentiert ist. Im Vergleich dazu ist das angrenzende exokrine Gewebe in beiden Fällen nur zu einem geringen Prozentsatz zerstört. Sowohl endokrine als auch exokrine Zelltrümmer sind mit Protein A-Gold-Partikeln besetzt. Mit fortschreitendem Grad der Zerstörung wird die Markierung dichter, so daß bei stärkster Zerstörung die Zelltrümmer unter den Gold-Partikeln zum Teil nicht mehr zu identifizieren sind. Wohl aber lassen sich endokrine und exokrine Zellen in diesem Stadium noch unterscheiden. Dabei sind, wie Abb. 2 zeigt, die endokrinen Zellen signifikant stärker mit Gold beladen.

Anders sind die Verhältnisse bei den diabetischen BB Wistar-Ratten, wo erstaunlich viele Inselzellen erhalten sind. Der Zerstörungsprozeß ist nur geringgradig ausgeprägt. Zelltrümmer sind spärlich vorhanden. Abb. 3 zeigt eine entsprechende Schnittübersicht. Das BB-Inselgewebe ist im Vergleich zu den mit Streptozotocin behandelten Mäusen nur wenig mit Protein A-Gold besetzt; dies gilt ganz besonders für exokrine Zelltrümmer.

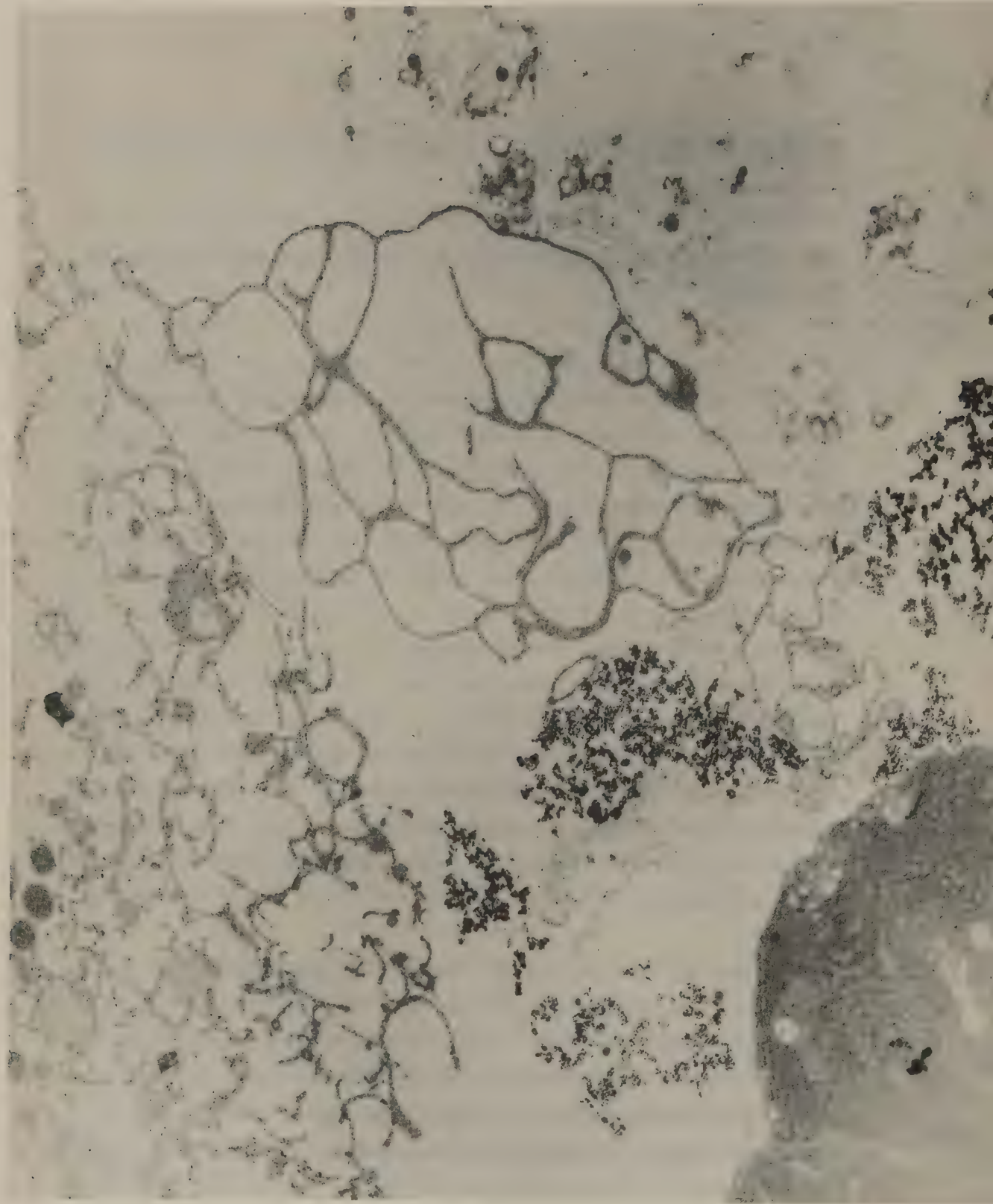


Abb. 1: Der repräsentative Ausschnitt isolierter Inselorgane einer diabetischen Maus zeigt eine komplette Destruktion des Endokrinums und eine partielle Destruktion des Exokrinums. Dabei sind die endokrinen Zelltrümmer, erkennbar an den erhaltenen Sekretgranula, wesentlich stärker mit Protein A-Gold markiert als die exokrinen Zelltrümmer.
Vergrößerung: 13.200 x

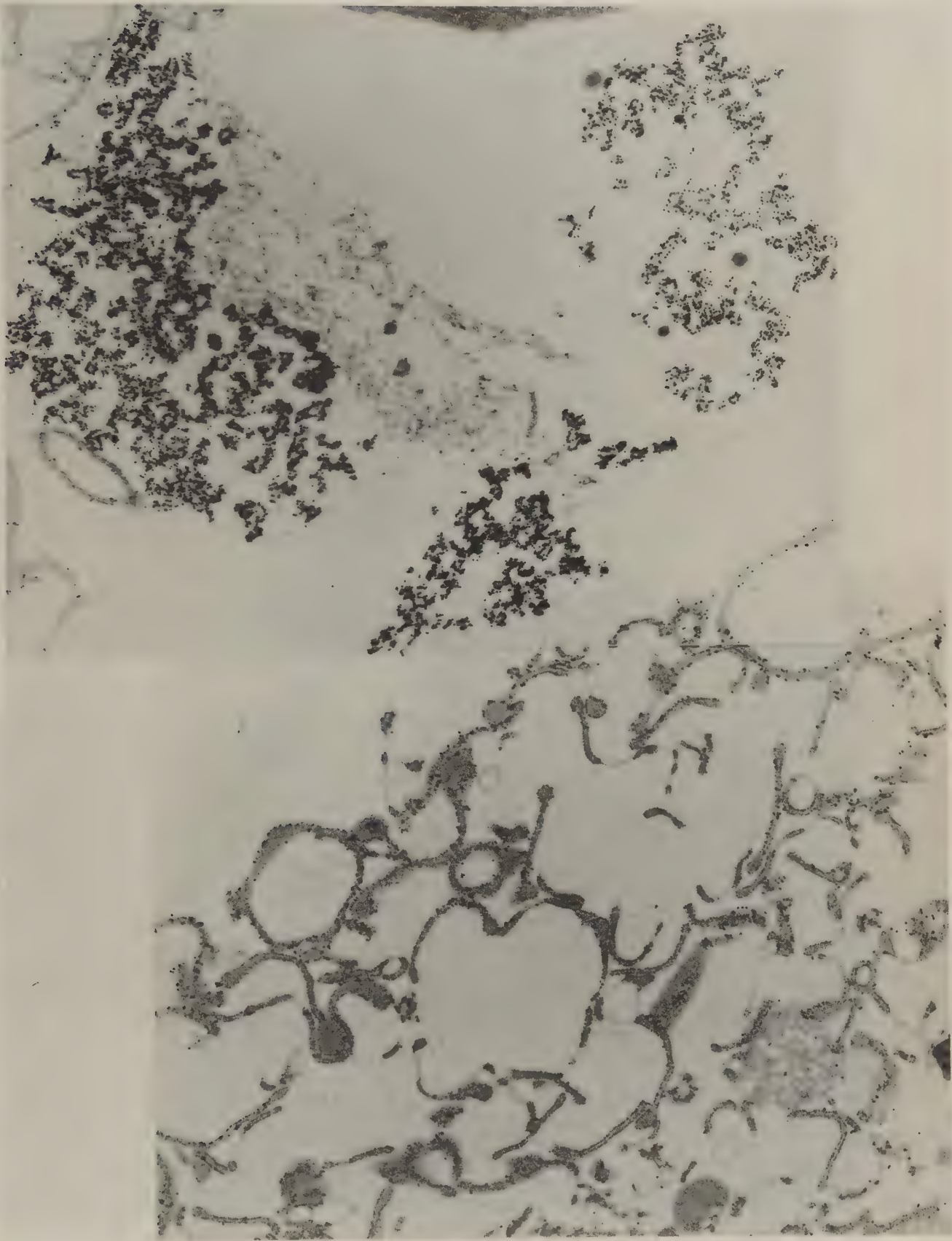


Abb. 2: In der Ausschnittvergrößerung der ersten Abbildung wird die unterschiedlich starke Markierung defekter endokriner und exokriner Zellen deutlich.
Vergrößerung: 20.000 x



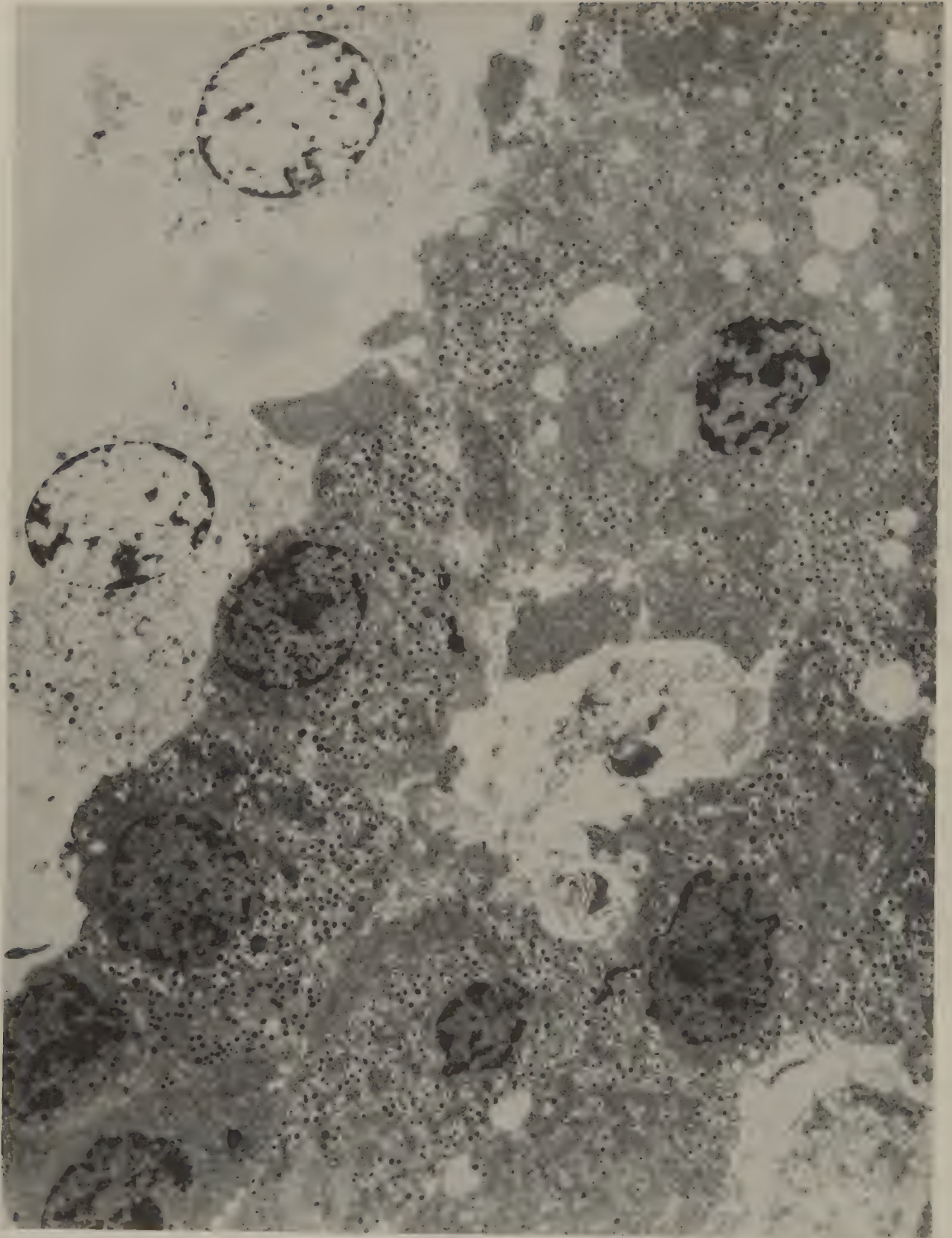


Abb. 3: Der repräsentative Ausschnitt isolierter Inselorgane einer diabetischen Ratte zeigt zahlreiche erhaltene endokrine Zellen. Im Gegensatz zu den diabetischen Mäusen waren hier die defekten endokrinen Zellen nur spärlich mit Protein A-Gold markiert.
Vergrößerung: 8.300 x

Für die quantitative Analyse des Gold-Bindungsverhaltens wurden sowohl bei den Versuchstieren als auch bei den Kontrolltieren mäßig zerstörte, eindeutig zu identifizierende Zellen betrachtet. Repräsentativ für die Auswertung zeigen die Abb. 4-6 Ausschnitte von A-Zellen, B-Zellen und exokrinen Zellen im Vergleich zwischen Versuchs- und Kontrollmäusen. In Abb. 7-9 sind die entsprechenden Zellen der Ratten dargestellt. Die Immunglobulin-markierenden Protein A-Gold-Partikel wurden gezählt und auf die Zellflächeneinheit normiert. Das Resultat für die Mäuse im Vergleich zu den Ratten ist aus Abb. 10 zu entnehmen. Hier zeigt sich, daß bei den Versuchsgruppen von Ratten und Mäusen (achter und zehnter Tag) die Gold-Beladung mäßig zerstörter exokriner und endokriner Zellen um 200 % gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren ansteigt. Im Vergleich zwischen den beiden Tiergruppen ist die Gold-Markierung endokriner Zellen bei den Ratten nur halb so stark ausgeprägt wie bei den Mäusen; die Markierung exokriner Zellen spielt bei den Ratten eine untergeordnete Rolle.

3.2 Bindungsverhalten von Protein A an die verschiedenen ultrastrukturellen Zellbestandteile

Zur Spezifizierung der Bindungsstellen wurden die Gold-Partikel in bezug auf ihre Bindung an Membranen und bestimmte zytoplasmatische Bestandteile, wie rauhes endoplasmatisches Retikulum (RER), zytoplasmatische Seite der Plasmamembran (CM), Sekretgranula (SG) und Mitochondrien (M) getrennt betrachtet und in einer festgelegten Flächeneinheit ausgewertet. Dabei wurde die Flächeneinheit so gewählt, daß sie mit vergleichbarem zerstörten Zellmaterial ausgefüllt war. Anschließend wurde jeweils das Verhältnis der spezifischen Bindungsstellen zur Summe aller markierten Bindungsstellen in der Flächeneinheit gebildet. Dadurch lassen sich die Relationen der Bindungen an verschiedene Zellstrukturen analysieren. Bei dieser Art der Darstellung kommt der absolute Anstieg der Markierung bei den Versuchstieren nicht zum Ausdruck.

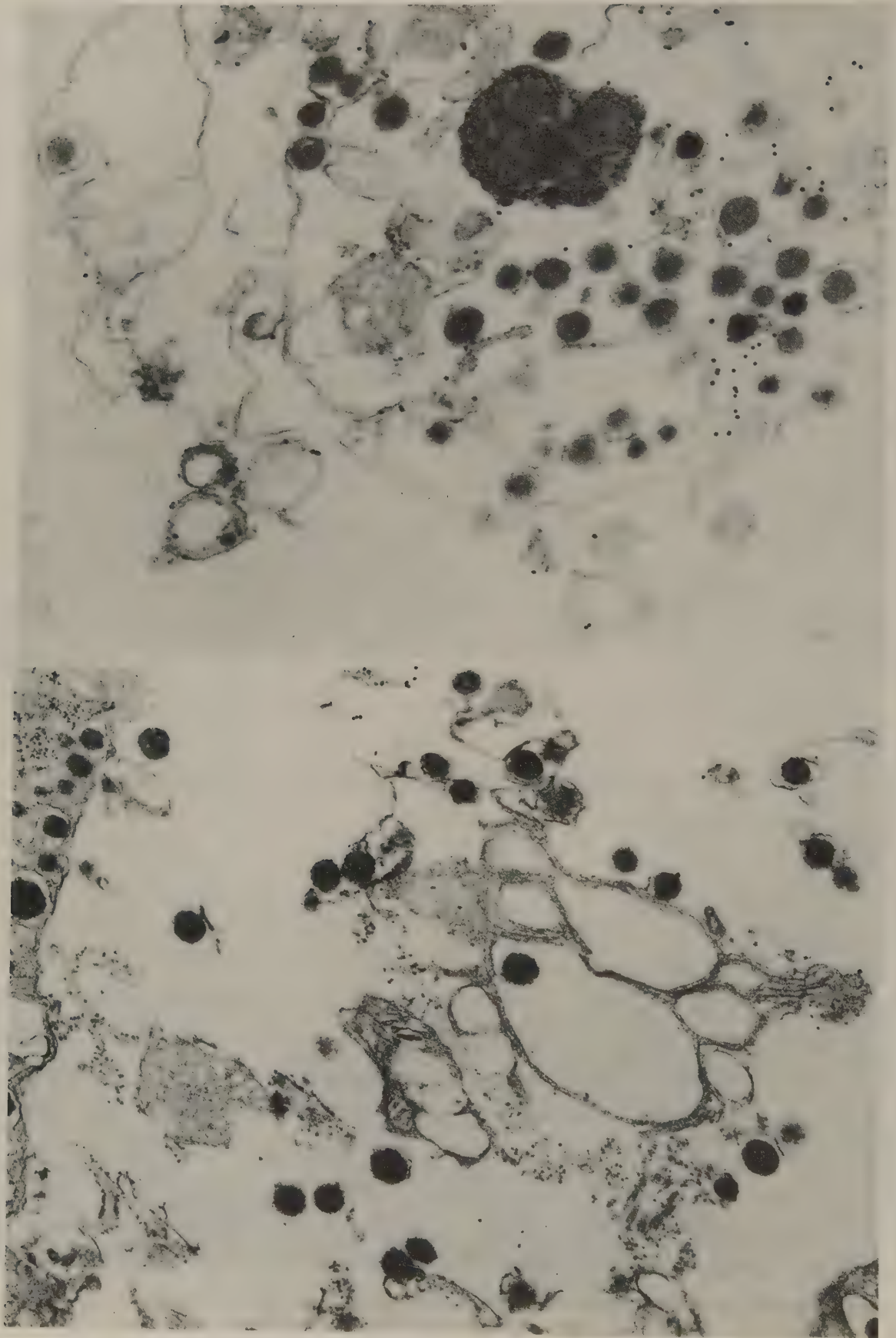


Abb. 4: Die oben abgebildete defekte A-Zelle einer diabetischen Maus weist eine stärkere IgG-spezifische Protein A-Gold-Markierung auf als die darunter abgebildete A-Zelle einer nicht diabetischen Maus. Man erkennt die Bevorzugung der Bindung an das raue endoplasmatische Retikulum.
Vergrößerung: 40.000 x

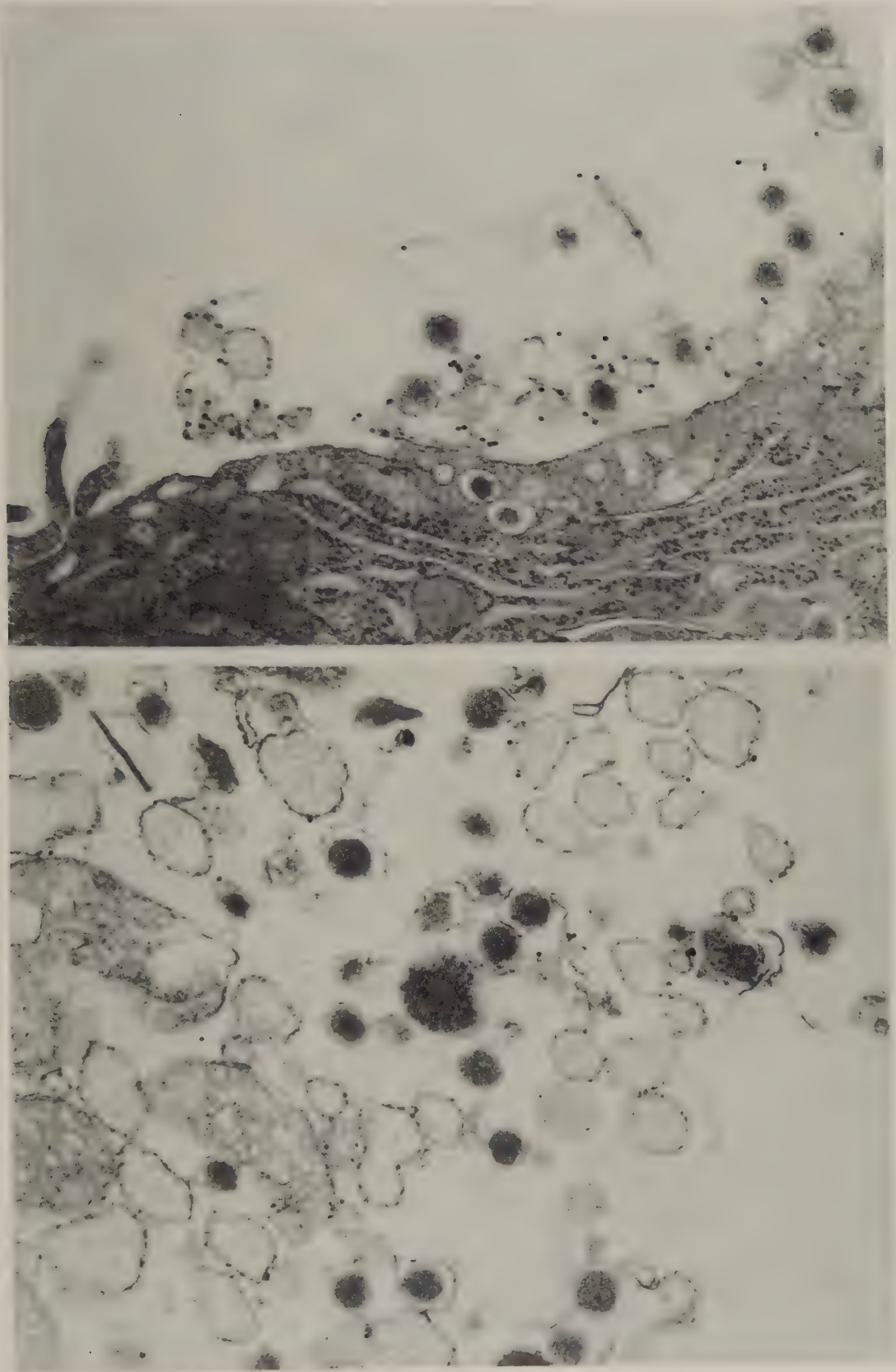


Abb. 5: Die oben abgebildete defekte B-Zelle einer diabetischen Maus weist eine stärkere IgG-spezifische Protein A-Gold-Markierung auf als die darunter abgebildete B-Zelle einer nicht diabetischen Maus. Im Unterschied zu allen anderen Zellen kommt es bei den B-Zellen der diabetischen Mäuse zu einer deutlichen Zunahme der Bindung an die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran.
Vergrößerung: 40.000 x

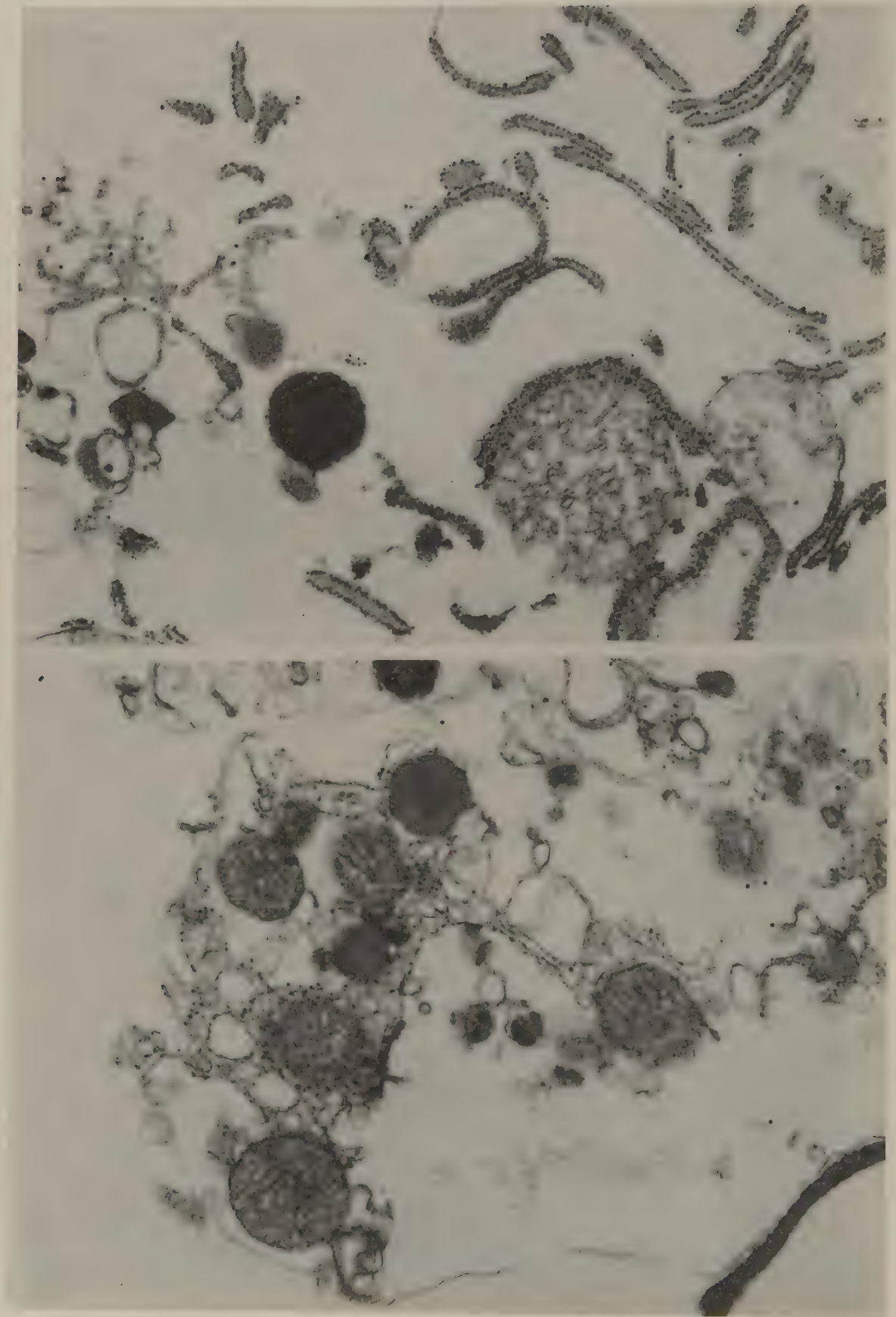


Abb. 6: Die oben abgebildete defekte exokrine Zelle einer diabetischen Maus weist eine stärkere IgG-spezifische Protein A-Gold-Markierung auf als die darunter abgebildete exokrine Zelle einer nicht diabetischen Maus. Man erkennt die Bevorzugung der Bindung an das rauhe endoplasmatische Retikulum.
Vergrößerung: 40.000 x

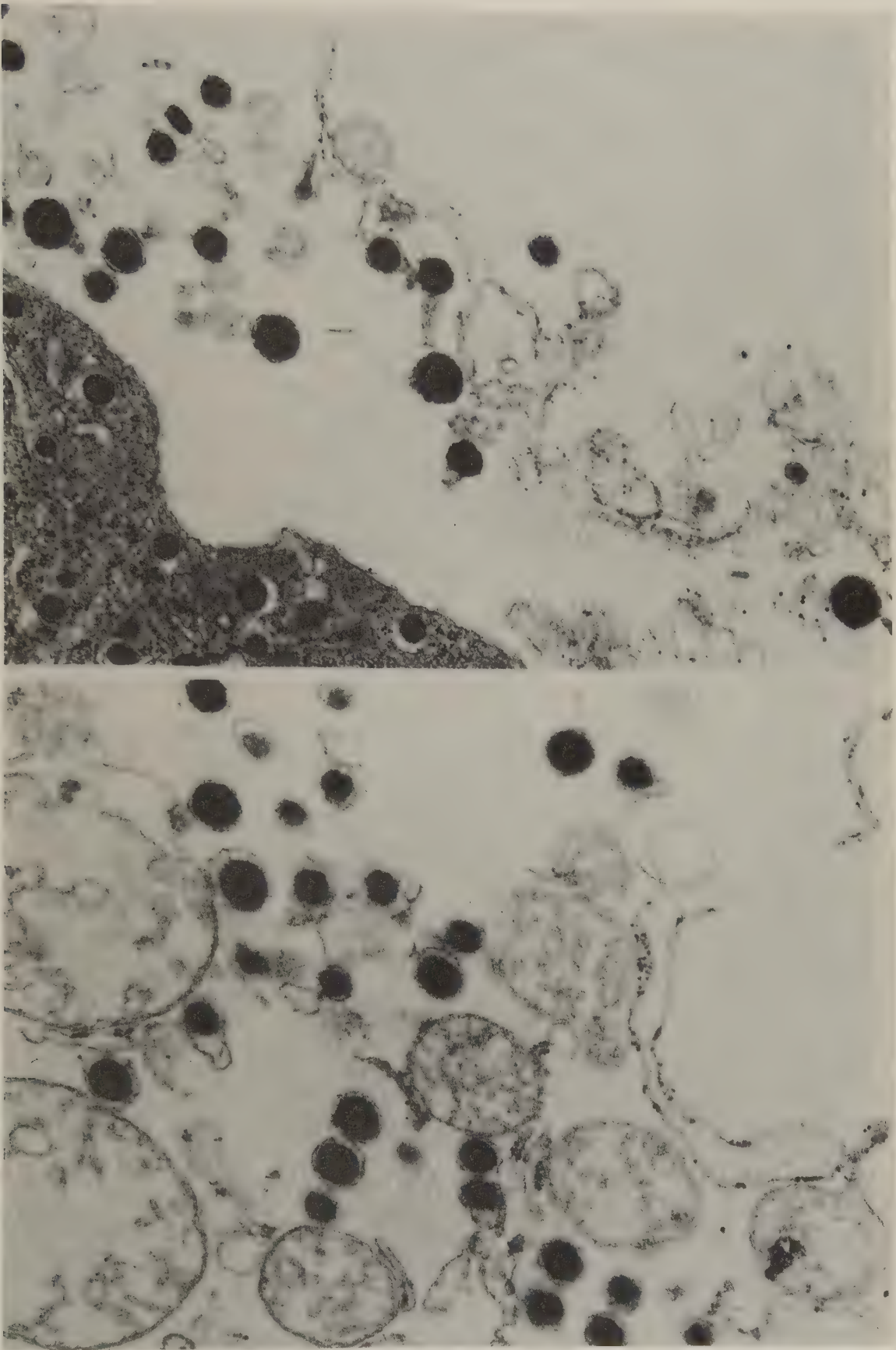


Abb. 7: Die oben abgebildete defekte A-Zelle einer diabetischen Ratte weist eine stärkere IgG-spezifische Protein A-Gold-Markierung auf als die darunter abgebildete A-Zelle einer nicht diabetischen Ratte. Im Vergleich zu den Mäusen ist die Markierung bei den Ratten weniger stark ausgeprägt. Auch hier erkennt man eine bevorzugte Bindung an das raue endoplasmatische Retikulum. Vergrößerung: 40.000 x

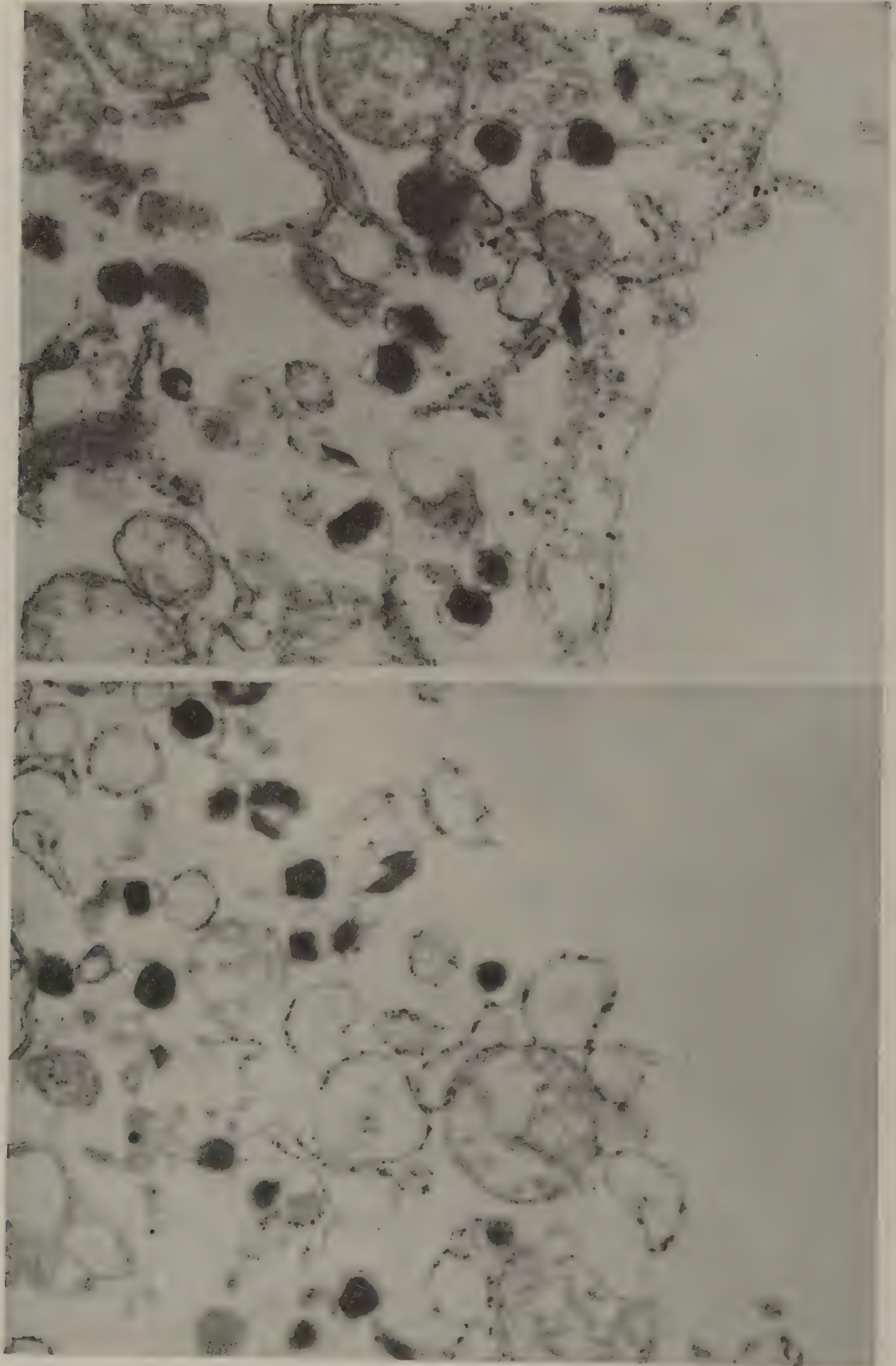


Abb. 8: Die oben abgebildete defekte B-Zelle einer diabetischen Ratte weist eine stärkere IgG-spezifische Protein A-Gold-Markierung auf als die darunter abgebildete B-Zelle einer nicht diabetischen Ratte. Bei den B-Zellen der Ratten ist eine verstärkte Bindung an die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran nicht nachweisbar.
Vergrößerung: 40.000 x

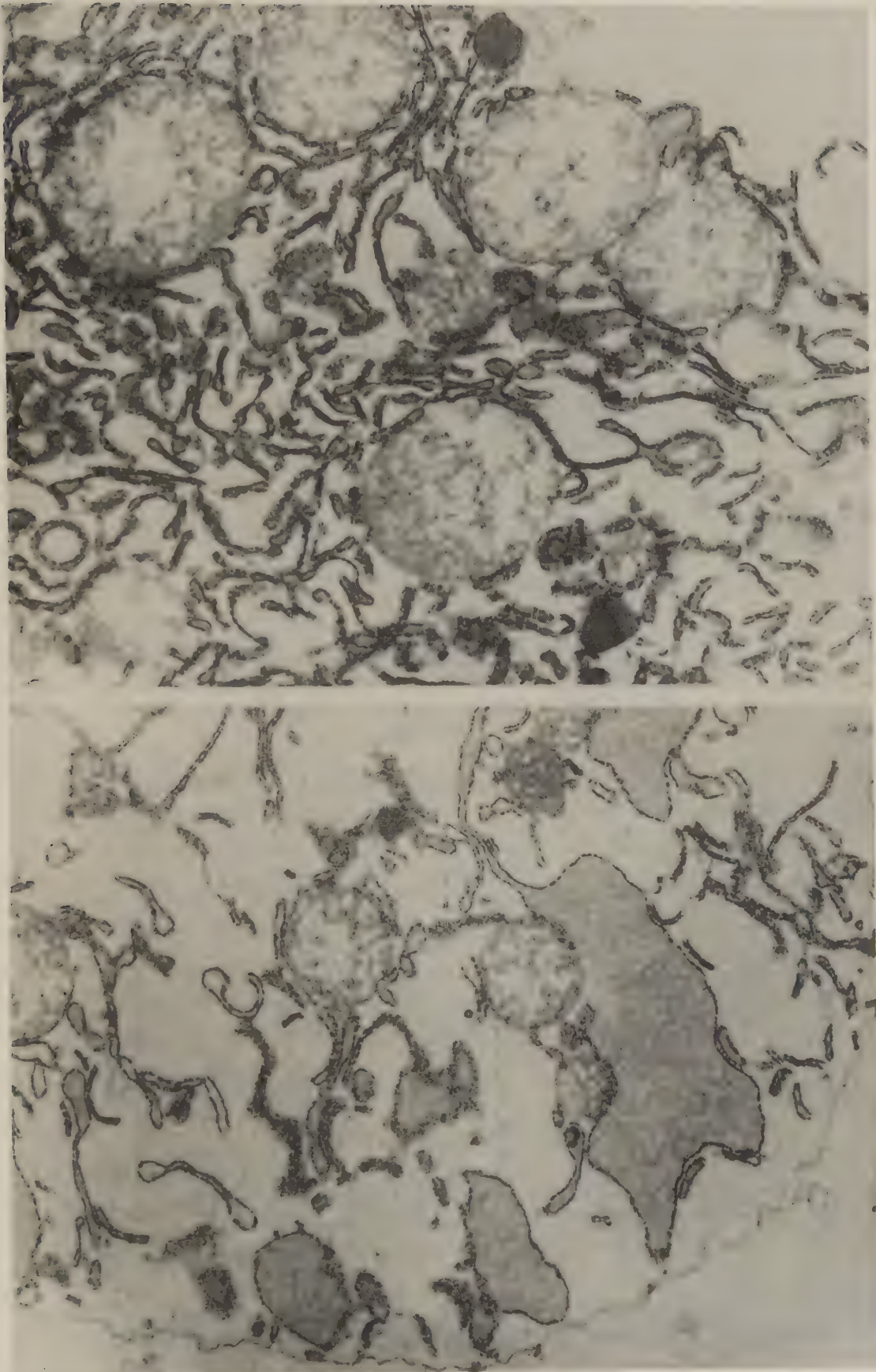


Abb. 9: Die oben abgebildete defekte exokrine Zelle einer diabetischen Ratte weist eine stärkere IgG-spezifische Protein A-Gold-Markierung auf als die darunter abgebildete exokrine Zelle einer nicht diabetischen Ratte. Die Bindung an das exokrine Gewebe der Ratten ist nur sehr schwach ausgebildet.
Vergrößerung: 20.000 x

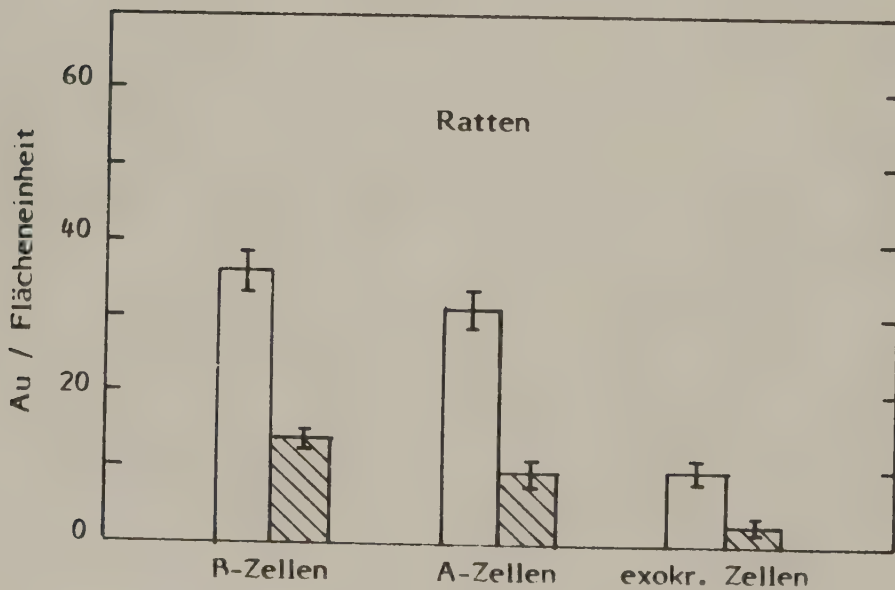
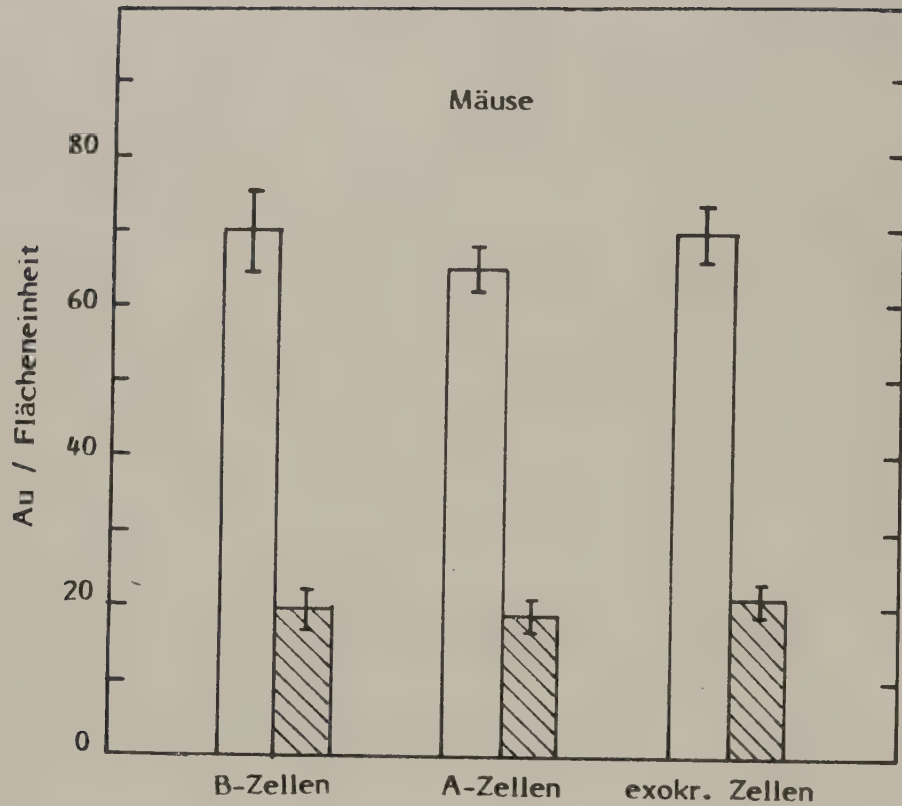


Abb. 10:

Die Anzahl der Protein A-Gold-Bindungsstellen (Au) pro Flächeneinheit bei mäßig zerstörten B-Zellen, A-Zellen und exokrinen Zellen der Versuchstiere ist im Vergleich zu den Kontrolltieren (schraffiert) dargestellt. Unabhängig von Zelltyp und Tierspezies kommt es bei den Versuchstieren zu einem Anstieg der Markierung um etwa 200 %.

Das Ergebnis für die Bindungsstellen an das RER und an die CM von Pankreaszellen der Mäuse zeigt Abb. 11. Man erkennt, daß die Gold-Markierung am RER überwiegt und bei den Versuchstieren einen deutlichen Anstieg um 40 % gegenüber den Kontrolltieren aufweist. Dieser Anstieg betrifft endokrine A- und B-Zellen und exokrine Zellen in gleichem Maße. Die Protein A-Gold-Bindung an die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran weist bei A-Zellen und exokrinen Zellen keinen Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollmäusen auf. Im Gegensatz dazu läßt sich bei den B-Zellen ein signifikanter Anstieg um 200 % bei den Versuchstieren feststellen. Dieses Ergebnis wird durch Abb. 5 dokumentiert. Die Markierung von SG bzw. M ist gering und zeigt keinen relativen Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. Bindung an die Zelloberfläche oder an den elektronendichten Inhalt der Sekretgranula wurde nicht beobachtet.

In Abb. 12 ist die oben beschriebene Auswertung der Untersuchung an den BB-Ratten dargestellt. Auch hier ist das RER am stärksten markiert. Der Anteil liegt bei Versuchs- und Kontrollratten bei 35 % der gesamten Markierung; das entspricht dem Ergebnis bei den Kontrollmäusen. Anders als bei den mit Streptozotocin behandelten Mäusen läßt sich bei den diabetischen Ratten kein relativer Bindungsanstieg an die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran nachweisen. Der prozentuale Anteil der Goldbesetzung von SG und M ist auch bei den Ratten gering.

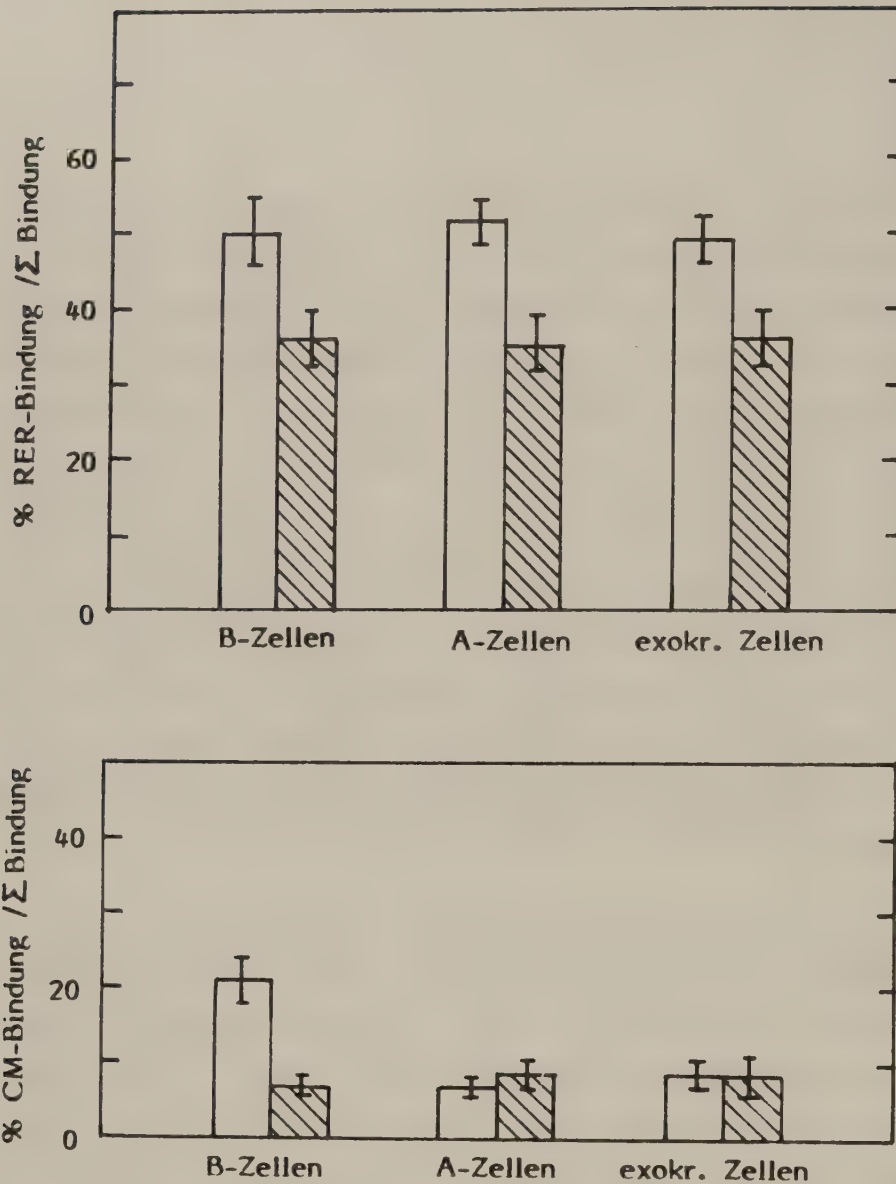


Abb. 11:

Der relative Anteil der Protein A-Gold-Bindung an das RER bzw. an die CM von Pankreaszellen bezogen auf die Gesamtzahl der Bindungsstellen ist bei den diabetischen Mäusen im Vergleich zu den nicht diabetischen Mäusen (schraffiert) dargestellt. Hierbei zeigt sich, daß die Gold-Markierung am RER überwiegt und bei allen Zelltypen der Versuchstiere einen Anstieg um 40 % gegenüber den Kontrolltieren aufweist. Ein signifikanter Anstieg der Markierung der CM um 200 % läßt sich nur bei den B-Zellen nachweisen.

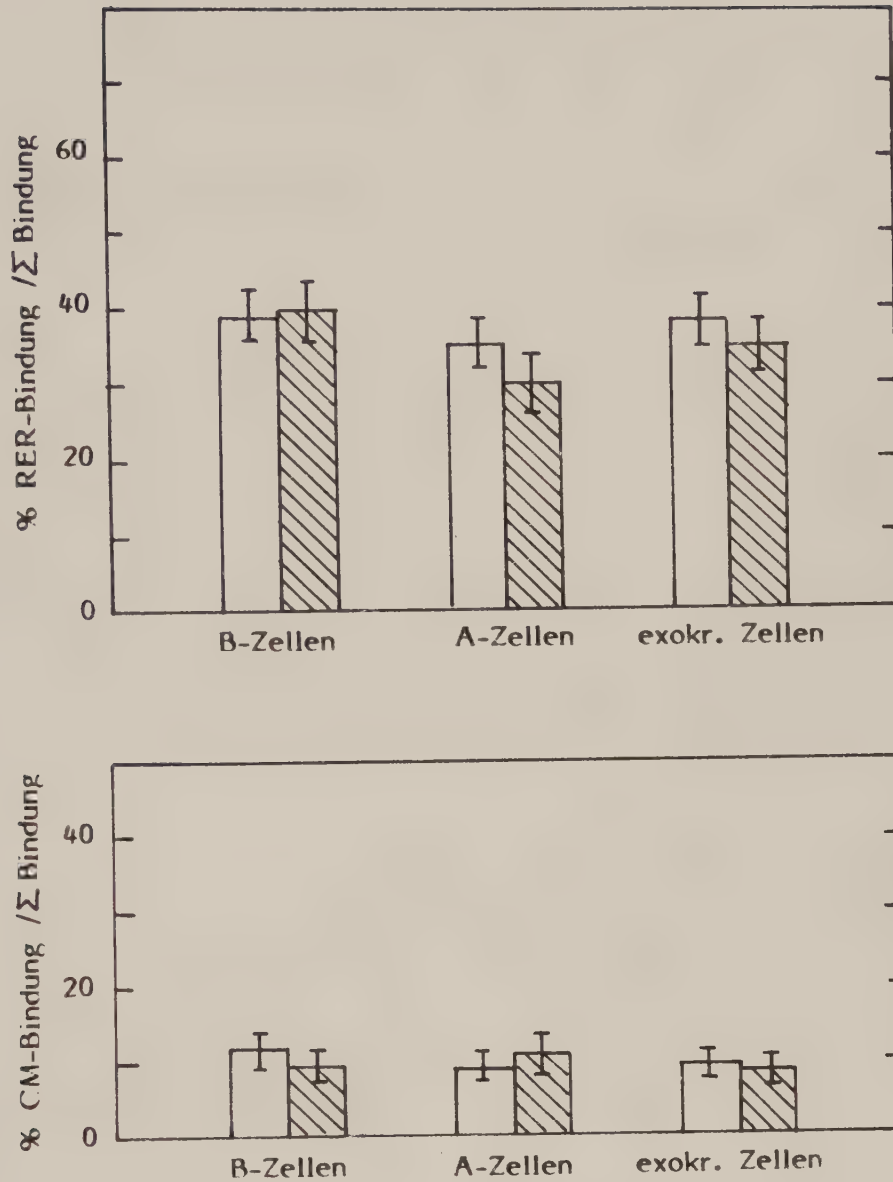


Abb. 12:

Der relative Anteil der Protein A-Gold Bindung an das RER bzw. an die CM von Pankreaszellen bezogen auf die Gesamtzahl der Bindungsstellen ist bei den diabetischen Ratten im Vergleich zu den nicht diabetischen Ratten (schraffiert) dargestellt. Auch hier überwiegt die Gold-Markierung am RER. Es läßt sich weder ein relativer Anstieg der Bindung an das RER noch an die CM nachweisen.

3.3 Protein A-Gold-Bindung im Zusammenhang mit der zellulären Infiltration durch Makrophagen

In allen Präparaten diabetischer Mäuse und Ratten konnten Makrophagen beobachtet werden. Erkennbar ist eine Phagozytoseaktivität bei den Versuchsmäusen (achter und zehnter Tag), wo Makrophagen zahlreiche Zelltrümmer von B-Zellen aufgenommen hatten, die eine dichte Gold-Markierung zeigten, wie es in Abb. 13 dargestellt ist. Auch in den Inseln der Kontrolltiere konnten vereinzelt Makrophagen nachgewiesen werden. Wie aus Abb. 14 hervorgeht, waren die hier gelegentlich phagozytierten Zellbestandteile nur spärlich mit Gold markiert.

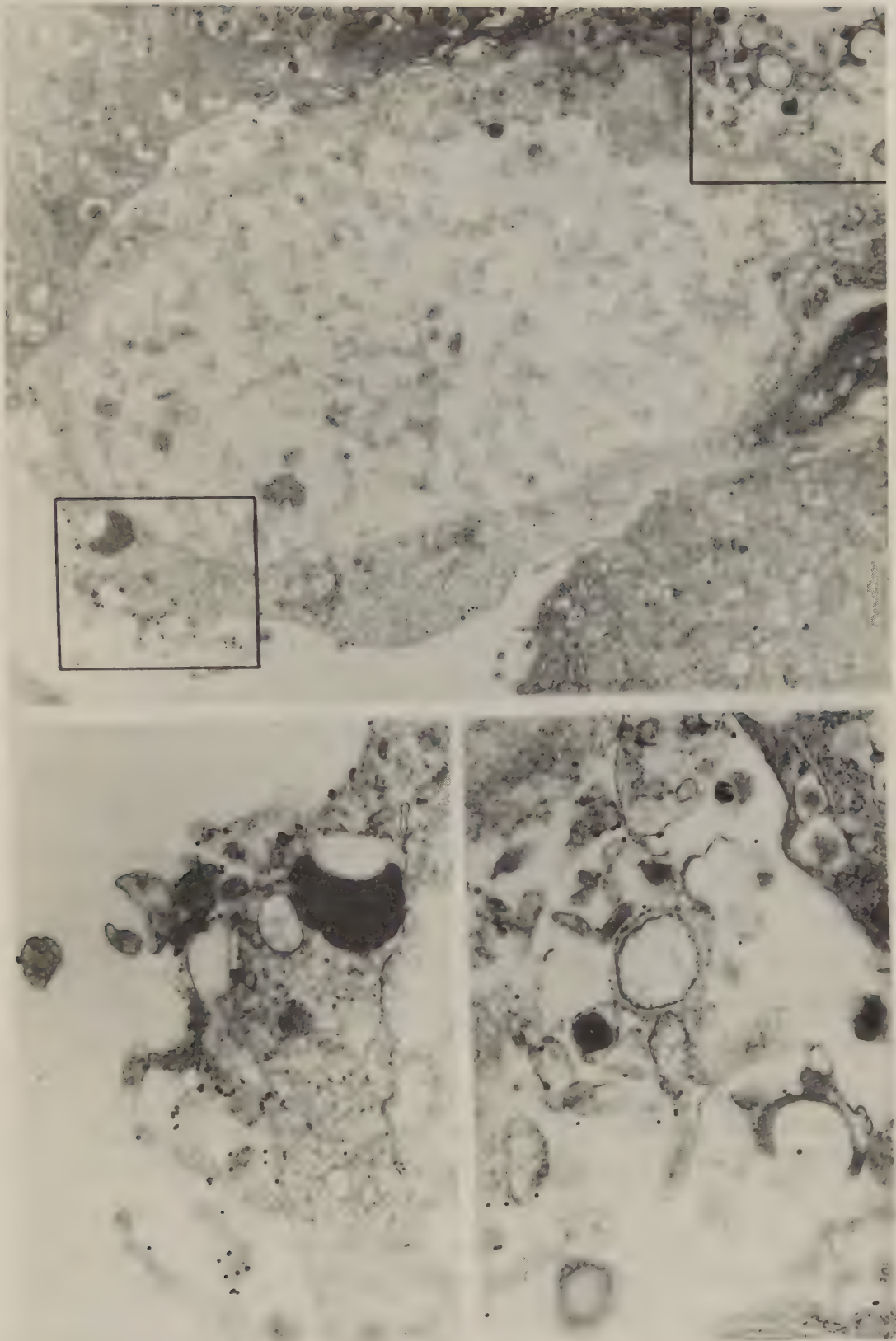


Abb. 13: Mit Protein A-Gold beladene B-Zell-Trümmer im Inselorgan einer diabetischen Maus werden von einem Makrophagen phagozytiert.
Vergrößerung: 16.000 x bzw. 40.000 x

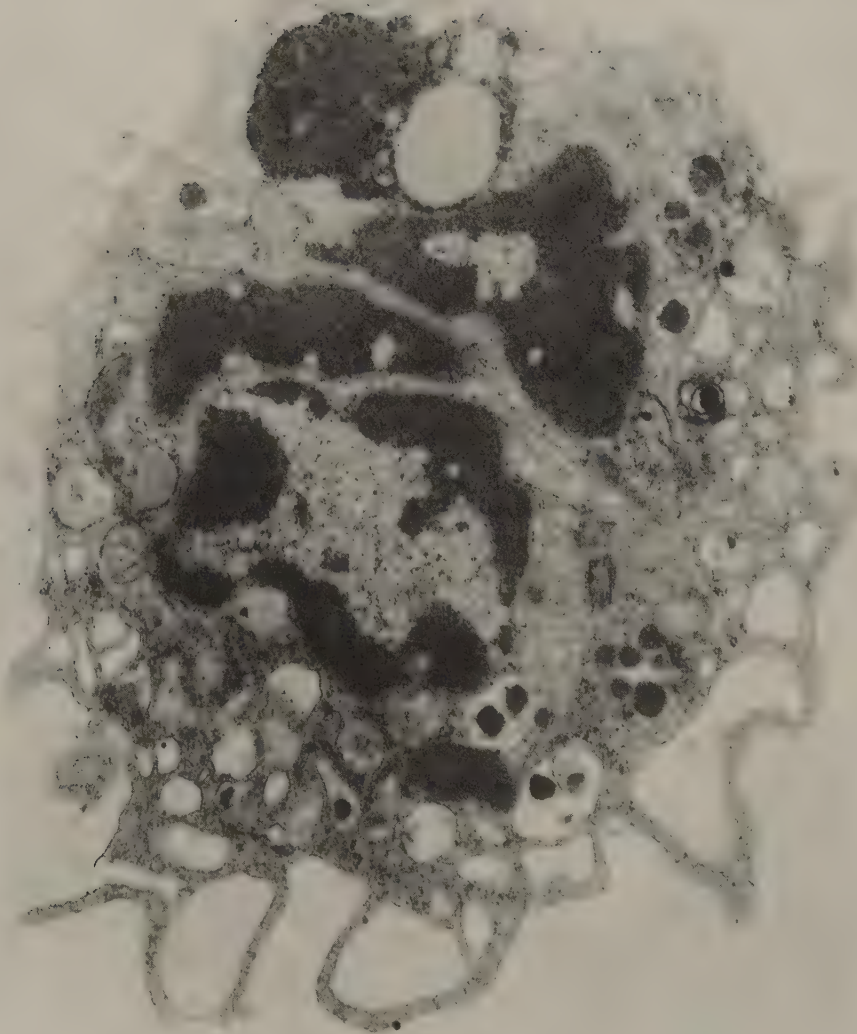


Abb. 14: Nicht markierte Sekretgranula einer B-Zelle im Inselorgan einer nicht diabetischen Maus werden von einem Makrophagen phagozytiert.
Vergrößerung: 18.000 x

4. DISKUSSION

In dieser Untersuchung zum Auftreten und zum Bindungsort von ICA beim experimentellen Diabetes von Mäusen und beim spontanen Diabetes von BB Wistar-Ratten konnten zahlreiche Bindungen von Protein A an Zellstrukturen des Pankreas nachgewiesen werden. Da die Reaktion von Protein A mit dem Fc-Teil der γ -Globuline als spezifisch angesehen werden kann (30), muß daraus geschlossen werden, daß in beiden Fällen Inselzellantikörper auftreten. Dabei zeigten sich einige Unterschiede zwischen den beiden Tiermodellen hinsichtlich der Anzahl und des Bindungsortes der Inselzellantikörper.

Bei den diabetischen Mäusen kommt es zu einem starken Anstieg von Protein A-Gold-Bindungsorten im endokrinen und auch im exokrinen Pankreasgewebe. Hierbei korreliert ein vermehrter Zelluntergang mit einem verstärkten Auftreten von Protein A-Gold-markierten Antikörpern. Dieser Antikörperanstieg mit dem Grad der Zellzerstörung könnte als Reaktion des Immunsystems auf Zelluntergang gedeutet werden, als Immunantwort auf Zelltrümmer, um so die Phagozytose durch Makrophagen einzuleiten. In diesem Sinne wäre auch zu verstehen, daß bei den Kontrollmäusen in geringem Maße ebenfalls Antikörpermarkierung an defekten Zellen und das Auftreten von Makrophagen zu beobachten war.

Dem Antikörperanstieg mit fortschreitender Zellzerstörung ist ein anderer Prozeß überlagert, der bei der Analyse des Gold-Bindungsortes als Indiz für die Antikörperspezifität deutlich wird. Es zeigt sich, daß die Bindung an das RER und die CM eine besondere Rolle spielt, da sie bei den Versuchstieren stärker ansteigt als die Bindung an alle anderen Zellstrukturen. Dabei ist die Markierung des RER bei endokrinen und exokrinen Zellen der diabetischen Mäuse gleich stark erhöht. Möglicherweise läßt sich dieser Antikörperanstieg als nicht Zell-spezifische Schädigung am RER

aller Pankreaszellen durch Streptozotocin deuten, ähnlich den ICA beim humanen Diabetes, die mit zytoplasmatischen Bestandteilen aller Inselzelltypen reagieren. Dieser Effekt kann jedoch für die Pathogenese der spezifischen B-Zell-Zerstörung beim insulinpflichtigen Diabetes nicht die entscheidende Rolle spielen. Hier erwartet man vielmehr eine Schädigung, die sich insbesondere gegen B-Zellen richtet, beispielsweise einen isolierten Anstieg bestimmter Antikörper gegen B-Zell-Strukturen, entsprechend den ICSA beim Menschen, die spezifisch an Oberflächenantigene von B-Zellen binden. Tatsächlich läßt sich in diesem Versuch ein isolierter Anstieg der Markierung an der CM von B-Zellen nachweisen, der als das Auftreten von Antikörpern gegen die CM verstanden werden kann. Für eine Antikörperproduktion gegen die CM können verschiedene Ursachen diskutiert werden. Eine Hypothese stellt die durch Streptozotocin induzierte Schädigung der CM dar, die bewirkt, daß sie als körperfremd erkannt wird. Eine so erzeugte Antigenität kann zu einer Antikörperproduktion Anlaß geben, die schließlich die Zerstörung der Membran zur Folge hat.

Eine andere Hypothese geht von einer strukturellen Ähnlichkeit von Streptozotocin oder seiner Stoffwechselprodukte mit Bestandteilen der CM aus. Eine Immunantwort gegen das als Antigen wirkende Streptozotocin richtet sich dann gleichzeitig gegen die CM und führt so zur Schädigung der Membran. Als Voraussetzung für die Annahme eines Pathomechanismus, der sich gegen die CM richtet und dadurch die B-Zell-Zerstörung bewirkt, muß gelten, daß die Antikörper die intakte Zellmembran durchdringen können. Im Gegensatz zu einer Antikörper-Markierung von Zellbestandteilen einer bereits zerstörten Zelle wäre in diesem Falle die Antikörper-Besetzung als Ursache der Zellzerstörung anzusehen. Der Nachweis kann mit der Protein A-Gold-Methode allerdings nicht erbracht werden, da die kolloidalen Gold-Partikel die Zellmembran intakter Zellen nicht penetrieren können und so die Antikörper-Markierung zu einem Zeitpunkt erfolgt, zu dem die Zellmembran bereits zerstört ist.

Zell-spezifische Bindungen von ICSA, wie sie von Dyrberg et al. (37) beschrieben werden, können durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden; eine Markierung der Inselzelloberfläche fand nicht statt. Allerdings erfolgte die Untersuchung von Dyrberg auch mit einem Kaninchen-Antiserum, das mit Inselzellen von C57BL/6J-Mäusen immunisiert wurde und mit den Inselzellen gesunder Mäuse reagierte, während in der vorliegenden Arbeit die Bindungsorte der Auto-Antikörper an die Pankreaszellen der Mäuse selbst untersucht wurden.

Bei den Untersuchungen an den BB Wistar-Ratten ist die Antikörper-Reaktion nicht so ausgeprägt wie bei den Mäusen. Die Gold-Bindung steigt auch hier mit dem Zerstörungsgrad der Zellen an, jedoch bleibt das Bindungsmuster der Antikörper an den verschiedenen Zellstrukturen im Gegensatz zu den Mäusen bei Versuchs- und Kontrollratten unverändert. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß bei den Ratten die exokrinen Zellen eine wesentlich geringere Gold-Markierung zeigen als die endokrinen Zellen. Es liegt offensichtlich ein Pathomechanismus zugrunde, der speziell gegen das Endokrinum des Pankreas gerichtet ist. In diesem Tiermodell, in dem keine Noxe zur Auslösung eines Insulinmangel-Diabetes beiträgt, muß also primär eine genetisch determinierte Alteration entweder der endokrinen Pankreaszellen oder des Immunsystems angenommen werden. Geht man von einer Alteration der endokrinen Zellen aus, so läßt sich deren Gold-Bindung deuten als Antikörper-Markierung defekter Zellen im Rahmen eines Immunprozesses. Im anderen Falle muß man eine Autoimmunogenese in Betracht ziehen, wobei intakte endokrine Zellen durch autoaggressive Antikörper eines fehlgesteuerten Immunsystems zerstört werden. Eine durch IgG-Antikörper induzierte spezifische B-Zell-Schädigung läßt sich bei den BB-Ratten nicht nachweisen. Hier müssen andere Pathomechanismen, wie Schädigung durch IgG-Antikörper oder durch zelluläre Reaktionen infiltrierender Immunocyten diskutiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Pathogenese des Insulinmangel-Diabetes bei mit Streptozotocin behandelten Mäusen und bei BB Wistar-Ratten Gemeinsamkeiten im Auftreten von bestimmten Antikörpern gegen Pankreaszellen, aber auch Unterschiede in Anzahl, Bindungsort und Selektivität der Antikörper aufweisen. Welches dieser Modelle den Typ-I-Diabetes des Menschen am besten beschreibt, muß noch offenbleiben. In diesem Zusammenhang sollte das Auftreten von Makrophagen, die mit Antikörpern beladene Zelltrümmer von B-Zellen phagozytieren, Anlaß zur weiteren Untersuchung ihrer Rolle beim Typ-I-Diabetes geben.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Kolb, H., F.A. Gries (1981)
Diabetes und Autoimmunität
Intern. Welt 4, 12-19
- 2) Bottazzo, G.F., A. Florin-Christensen, D. Doniach (1974)
Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune
polyendocrine deficiencies
Lancet, 1279-1282
- 3) Irvine, W.J. (1979)
Immunological aspects of diabetes mellitus
In: Pierluissi, J. (ed) Endocrine pancreas and diabetes
Excerpta Medica, Amsterdam, 281-299
- 4) Bottazzo, G.F., R. Pujol-Borrell, D. Doniach (1981)
Humoral and cellular immunity in diabetes mellitus
Clin. Immunol. Allergy 1, 139-159
- 5) Helmke, K., A. Otten, W. Willems (1980)
Islet cell antibodies in children with mumps infection
Lancet II, 211
- 6) Craighead, J.E. (1979)
Does insulin dependent diabetes mellitus have a viral etiology?
Hum. Pathol. 10, 267-278
- 7) Gamble, D.R., K.W. Taylor, H. Cumming (1973)
Coxsackie viruses and diabetes mellitus
Br. Med. J. 4, 260-262
- 8) Müntefering, H. (1972)
Zur Pathologie des Diabetes mellitus der weißen Maus bei der
EMC-Virusinfektion
Virchows Arch. Abt. A. Pathol. Anat. 356, 207
- 9) Yoon, J.W., T. Quodera, A.L. Notkins (1978)
Virus-induced diabetes mellitus
Beta cell damage and insulin-dependent hyperglycemia in mice
infected with Coxsackie virus B4
J. Exp. Med. 148, 1008

- 10) Dieterle, P. (1981)
Aktuelle Probleme des Diabetes
Münch. med. Wschr. 123, 677-679
- 11) Kolb, H., F.A. Gries (1982)
Viruserkrankungen, Autoimmunität und Insulinmangel-Diabetes
Deutsches Ärzteblatt 18, 39-44
- 12) Lernmark, A., S. Baekkeskov (1981)
Islet cell antibodies - theoretical and practical implications
Diabetologia 21, 431-435
- 13) Hepp, K.D. (1981)
Zur Pathogenese des Diabetes mellitus
Internist 22, 183-186
- 14) Huang, S.-W., G.E. Taylor (1981)
Immune insulitis and antibodies to nucleic acids induced with streptozotocin in mice
Clin. exp. Immunol. 43, 425-429
- 15) Like, A.A., A.A. Rossini (1976)
Streptozotocin-induced pancreatic insulitis: New model of diabetes
Science 293, 415-418
- 16) Like, A.A., M.C. Appel, R.M. Williams, A.A. Rossini (1978)
Streptozotocin-induced pancreatic insulitis in mice:
Morphologic and physiologic studies
Lab. Invest. 38, 470
- 17) Rossini, A.A., A.A. Like, W.L. Chick, M.C. Appel, G.F. Cahill (1977)
Studies of streptozotocin-induced insulitis and diabetes
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 2485-2489
- 18) Nakhooda, A.F., A.A. Like, C.I. Chappel, F.T Murray, E.B. Marliss (1977)
The spontaneously diabetic Wistar rat
Diabetes 26, 100-112
- 19) Marliss, E.B., A.F. Nakhooda, P. Poussier, A.A.F. Sima (1982)
The diabetic syndrome of the BB Wistar rat: Possible relevance of Type I Diabetes in man
Diabetologia 22, 225-232

- 20) Dyrberg, T., A.F. Nakhooda, S. Baekkeskov, A. Lernmark, P. Poussier, E.B. Marliss (1982)
Islet cell surface antibodies and lymphocyte antibodies in the spontaneously diabetic BB Wistar rat
Diabetes 31, 278-281
- 21) Pollard, D.R., K. Gupta, L. Mancino, I. Hynie (1983)
An immuno fluorescence study of anti-pancreatic islet cell antibodies in the spontaneously diabetic BB Wistar rat
Diabetologia 25, 56-59
- 22) Kiesel, K., G.Freytag, J. Biener, H. Kolb (1980)
Transfer of experimental autoimmune insulitis by spleen cells in mice
Diabetologia 19, 516-520
- 23) Moskalewski, S. (1965)
Isolation and culture of the islets of Langerhans of the Guinea pig
Gen. Comp. Endocrinol. 5, 342-353
- 24) Lacy, P.E., M. Kostianovsky (1967)
Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas
Diabetes 16, 35-39
- 25) Lernmark, A. (1974)
The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets
Diabetologia 10, 431-438
- 26) Sjöquist, J., J. Movitz, I.-B. Johansson, H. Hjelm (1972)
Localization of protein A in the bacteria
Eur. J. Biochem. 30, 190-194
- 27) Forsgren, A., J. Sjöquist (1966)
Protein A from *S. aureus*
J. Immunol. 97, 822-827
- 28) Sjöquist, J., A. Forsgren, G.T. Gustafson, G. Stalenheim (1967)
Biological importance of the Fc-region of gamma globulins
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, 577-581

- 29) Kronvall, G., H.M. Grey, R.C. Williams (1970)
Protein A reactivity with mouse immunoglobulins
J. Immunol. 105, 1116-1123
- 30) Kolb-Bachofen, V. (1983)
Entdeckung und Beschreibung eines spezifischen Partikel-Rezeptors:
Der Galaktose-erkennende Rezeptor auf den sessilen Makrophagen der
Leber
Habilitationsschrift, Universität Düsseldorf
- 31) Goodman, S.L., G.M. Hodges, D.C. Livingston (1980)
A review of the colloidal gold marker system
Scanning Electron Microscopy, 133-146
- 32) Biberfeld, P., V. Ghetie, J. Sjöquist (1975)
Demonstration and assaying of IgG antibodies in Tissues and on cells
by labelled staphylococcal protein A
J. Immunol. Methods 6, 249-250
- 33) Roth, J., M. Bendayan, L. Orci (1980)
FITC-Protein A-Gold complex for light and electron microscopic
immunocytochemistry
J. Histochem. Cytochem. 28, 55-57
- 34) Horisberger, M., J. Rosset (1977)
Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning
electron microscopy
J. Histochem. Cytochem. 25, 295-305
- 35) Spurr, A. (1969)
A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron
microscopy
J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43
- 36) Venable, J.H., R. Loggesshall (1965)
A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy
J. Cell. Biol. 25, 407-408
- 37) Dyrberg, T., Baekkeskov, S., Lernmark, A. (1982)
Specific pancreatic beta-cell surface antigens recognized by a
xenogenic antiserum
J. Cell. Biol. 94, 472-477

LEBENS LAUF

Name/Anschrift	Doris J. Schunk Siegfriedstr. 11 4000 Düsseldorf 11
Persönliche Daten	geb. am 26.07.1952 in Duisburg Familienstand: ledig
Schulbildung	4/59 - 4/63 Volksschule in Duisburg 4/63 - 5/71 Frau Rat Goethe-Gymnasium in Duisburg 25.05.1971 Reifezeugnis
Studium der Physik	10/71 - 1/78 Ruhr-Universität Bochum 12.10.1973 Vordiplom 31.01.1978 Diplom Diplomarbeit auf dem Gebiet der Kernphysik
Studium der Medizin	10/77 - 5/84 Universität Düsseldorf 02.04.1980 Ärztl. Vorprüfung 13.04.1981 Erster Abschnitt der Ärztl. Prüfung 07.04.1983 Zweiter Abschnitt der Ärztl. Prüfung Praktisches Jahr an der Universitätsklinik mit dem Wahlfach Neurochirurgie 29.05.1984 Dritter Abschnitt der Ärztl. Prüfung 27.06.1984 Approbation als Arzt
Berufstätigkeit	01.09.1984 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin/Kardiologie der Fachklinik Rhein/Ruhr, Essen

Herrn Prof. Dr. W. Vogell danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine hilfreiche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. Kolb-Bachofen, die mit klärenden Diskussionen und nützlichen Ratschlägen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Der Technischen Assistentin A. Schlömer und der Fotografin B. Wenzel-Unger danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf.

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. Hopf

Referent

gez.: Prof. Dr. Phil. Vogell

Korreferent

gez.: Prof. Dr. med. Frenzel

